

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年7月21日(21.07.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/066201 A1

(51) 国际分类号⁷: C07K 7/08, 14/47, A61P 29/00, 37/06

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/001362

(22) 国际申请日: 2004年11月26日(26.11.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200410000851.2 2004年1月5日(05.01.2004) CN

(71)(72) 发明人/申请人: 吴文言(WU, Wenyuan) [CN/CN];
中国广东省广州市新港西路 135号中山大学生命科学
学院, Guangdong 510275 (CN).

(74) 代理人: 广州市新诺专利事务所有限公司
(GUANGZHOU SINO PATENT AGENT CO.,
LTD.); 中国广东省广州市仓边路 87号四楼,
Guangdong 510030 (CN).

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护):
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,

BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW

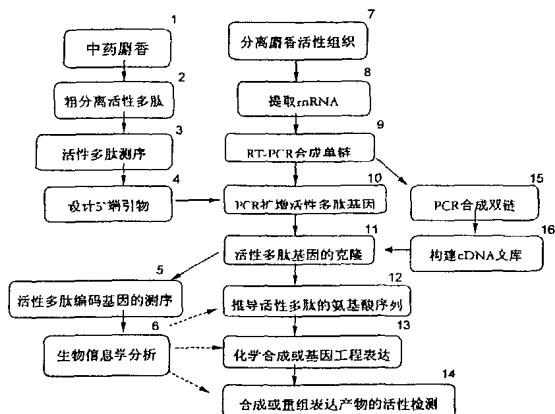
(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护):
ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: AMINO ACID SEQUENCES FROM ACTIVE PRINCIPLE OF MUSK AND THEIR ACETIC SALT, ALSO
THE PREPARATION AND USAGE

(54) 发明名称: 麝香有效成分的氨基酸序列和醋酸盐及其制备方法和应用



- 1 MUSK OF CHINESE TRADITIONAL MEDICINE
- 2 CRUDE SEPARATION OF THE ACTIVE POLYPEPTIDE
- 3 SEQUENCE ACTIVE POLYPEPTIDE
- 4 DESIGN 5-END PRIMER
- 5 SEQUENCE THE GENE CODING THE ACTIVE POLYPEPTIDE
- 6 BIOINFORMATICS ANALYSIS
- 7 DISPART THE ACTIVE TISSUE OF MUSK
- 8 EXTRACT mRNA
- 9 SYNTHESIS SIGNAL STRAND BY RT-PCR
- 10 AMPLIFY THE GENE OF ACTIVE POLYPEPTIDE BY PCR
- 11 CLONING THE GENE OF ACTIVE POLYPEPTIDE
- 12 DERIVE THE ACTIVE POLYPEPTIDE SEQUENCE
- 13 CHEMICAL SYNTHESIS OR EXPRESS BY THE GENETIC ENGINEERING
- 14 DETERMINE ACTIVITY OF THE SYNTHETIC OR EXPRESSED PRODUCT
- 15 SYNTHESIS DOUBLE STRANDS BY PCR
- 16 MADE cDNA LIBRARIES

(57) Abstract: In the present invention, there are disclosed some amino acid sequences obtained from the active principle in Chinese traditional medicine musk, such as SDSECPLLCEVWILK, SDSECPLLPRQGTGSLH, IDCECPLLEAKCPSFPLWPQG REERQ, SDSECPLLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC and their acetic salt. The preparation method of the above said sequences and their application for anti-inflammatory medicine or immunity inhibitor are also disclosed by this invention.

[见续页]

WO 2005/066201 A1



(57) 摘要

本发明公开了从中药麝香的有效成分中获得的氨基酸序列
**SDSECPLLCEVVWILK, SDSECPLLPRQGTGSLH, IDCECPLLEAKCPSFPLWPQG
REERQ, SDSECPLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC** 及其醋酸盐。本发明还公开
了上述氨基酸序列的制备方法及其在作为抗炎药物和免疫抑制药物的应用。

麝香有效成分的氨基酸序列和醋酸盐及其制备方法和应用

本发明所属技术领域

本发明涉及一种中药麝香有效成分的氨基酸序列及其醋酸盐。

在本发明之前的现有技术

5 中药有效成分的研究仍然是中药现代化领域一个前提性的关键问题。经过长期努力，我们已经初步阐明了数百种常用中草药的主要成分和大量主药效成分的基本药理作用。但是，整体来说，对中草药有效成分的研究是很不全面的。例如，在已发现的中药化学成分中，有很多与其临床药效没有对应关系。中药有效成分的研究在基础理论和研究手段上都亟待提高，而且必须引入新思路、新技术。在基因技术如此成熟的
10 今天，蛋白质/肽类部分应该作为中药有效成分研究的重点之一。

长期以来，由于技术手段的限制，以往对中药有效成分的研究大多集中在采用化学或物理方法对中药的有机化学成分（如黄酮类、甾醇类、甙类等）进行分析及合成，而非针对蛋白质/多肽等生物大分子进行研究。蛋白质/多肽是执行生命功能的重要成员，对中药开展肽类活性物质及其基因的研究，将直接获得治疗用药或药物先导物。

15 研究表明，麝香中含蛋白质约 25%，麝香肽的分子结构未见报道。目前可进行人工合成的是麝香酮、麝香吡啶类、C₁₉ 甾体等化学成分。

“六五”、“七五”期间，我国组织了对天然麝香化学成分谱以及重组人工麝香的重点攻关研究，由于技术方法与研究手段的限制，尽管我国学者当时已从天然麝香分离获得含有 15 种氨基酸的麝香多肽，并证明其对巴豆油引起小鼠耳部炎症的抑制作用是氢化可的松的 36 倍（以 mg/kg 相比较）或者 500 倍以上（以摩尔浓度相比较），是麝香发挥药效不可缺少的成分。但在申报新药时，未能合成麝香多肽，而是以其它产物（芳活素）替代。这也是人们仍然推崇天然麝香的原因之一。

25 根据麝香多肽具有比糖皮质激素强的药效作用数据推测：麝香多肽在免疫介导的组织损伤与疾病如过敏性哮喘、肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、结节性动脉炎、重症肌无力、糖尿病等疾病的治疗中可以发挥重要的作用。上述疾病目前在临幊上仍依赖糖皮质激素的应用，并由此带来了许多甾体激素引起的毒副作用，使这类疾病的治疗较为困难。麝香多肽药物的开发具有广泛的临幊应用价值和巨大的市场开发前景。

发明目的

30 本发明提供中药麝香的有效成分的多肽序列及其制备方法。

本发明采用的技术手段

为了实现中药麝香的有效成分的化学药物化，本发明提供：

一种从中药麝香的有效成分中获得的氨基酸序列 **SDSECPLLCEVWILK.**。

一种从上述的中药麝香的有效成分中获得的氨基酸序列

5 **SDSECPLLPRQGTGSLH.**

一种从上述的中药麝香的有效成分中获得的氨基酸序列 **IDCECPLEAKCPSFPLWPQGREERQ.**

一种从上述的中药麝香的有效成分中获得的氨基酸序列 **SDSECPLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC.**

10 上述多肽分子可以形成以下醋酸盐：

SDSECPLLCEVWILK 的醋酸盐，其结构为：(**SDSECPLLCEVWILK**) **Ac.**

SDSECPLLPRQGTGSLH 醋酸盐结构为：(**SDSECPLLPRQGTGSLH**) **Ac.**

IDCECPLEAKCPSFPLWPQGREERQ 的 醋 酸 盐 结 构 为：
(**IDCECPLEAKCPSFPLWPQGREERQ**) **Ac.**

15 **SDSECPLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC** 的 醋 酸 盐 结 构 为：
(**SDSECPLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC**) **Ac.**

为了快速、高效、大量地获得传统中药的有效成分，本发明提供一种中药有效成分的氨基酸序列获得方法，其特征在于：将含有中药有效成分的功能活性部位的活性多肽或蛋白质进行分离纯化，得到有药用价值的活性多肽/蛋白；利用药效学分析方法确证其药效后，进行氨基酸序列测定；然后，从动植物的功能活性部位或组织中制备 **cDNA** 文库，从中获取编码活性肽的目的基因；从而得到活性多肽的氨基酸序列。

20 上述的分离纯化是指采用蛋白质分离纯化技术（包括亲和层析、疏水层析等各种层析技术、以及凝胶电泳、高效液相色谱、质谱等方法），提取中药有效成分的功能活性部位的多肽或蛋白质。然后，通过常规的药理学实验对所得多肽或蛋白质进行药效学分析，以确定获得具有药用价值的活性多肽/蛋白，进行氨基酸序列分析。

25 制备 **cDNA** 文库是指：采集动植物含有有效成分的组织，提取细胞中的 **mRNA** 或总 **RNA**，然后利用 **RT-PCR** 方法获得 **cDNA**，将全部的 **cDNA** 片段克隆到表达载体上，含有不同 **cDNA** 片段的所有克隆的集合就称为 **cDNA** 文库，即理论上，该文库含有细胞中全部的基因片段。利用 **PCR** 技术从 **cDNA** 文库或直接从 **mRNA** 中获得编码中药多肽/蛋白的基因，将该基因进行序列分析，确证所得基因序列无误后，推导

出氨基酸序列。一方面可采用化学合成的方法进行多肽合成，另一方面，可将所获得的基因序列克隆到原核或真核表达载体上，构建重组质粒，转化宿主细胞，通过各种筛选标记获得工程菌，通过工程菌发酵培养和提取纯化得到重组活性多肽/蛋白。

中药有效成分的基因是麝香多肽的编码基因。麝香为鹿科动物林麝 (**Moschus berezovskii Flerov**) 脐下腺分泌物的干燥品，自古为中医常用的贵重药材，应用于防病治病已有两千多年的历史。我国最早的医药典籍《神农本草经》将麝香列为上品，历代医术均有收载。具有开窍醒神、活血通经、消肿止痛之功，剂量少，疗效确切，常用于昏迷、疼痛、炎肿等急症。我国近年来在人工麝香的研制及其药理作用的研究等方面虽然取得了可喜的进展，但主要集中在麝香酮等化学成分的人工合成上，对于麝香中的重要活性物质——麝香多肽及其基因的研究则尚未涉足。选择它作为药用基因进行化学方法的多肽合成或基因工程生产，一方面可突破上述采用芳活素作替代所造成的局限，另一方面可进行一系列中药基因资源的保护和开发。

附图说明

图 1 为本发明的一种麝香多肽的色谱分析洗脱图谱；

图 2 为从图 1 中分离的一个单一条带；

图 3 为合成多肽 **SDSECPLLCEVWILK** 的质谱分析图；

图 4 为合成多肽 **SDSECPLLPRQGTGSLH** 的质谱分析图；

图 5 为合成多肽 **IDCECPLLEAKCPSPLWPQGCREERQ** 的质谱分析图；

图 6 为合成多肽 **SDSECPLLNGTNTSSRFESINCFLSTEEGC** 的质谱分析图。

图 7 为本发明所述的氨基酸序列获得方法的技术流程图。

实施例

见图 (1-6)

麝香活性多肽的合成及药效学研究

为了首先确定目标物，本发明将天然麝香的水溶性部分进行分离纯化并作药效学分析。下面结合图 7 对整个流程进行详细说明。

1. 色谱分析 (见图 1) 与凝胶电泳分析 (见图 2)

天然麝香经有机溶剂 95% 乙醇等抽提后，溶于无菌水，制成分析用样品，样品离心后取上清液，用 $0.22 \mu m$ 滤膜过滤。进行 Tricine SDS-PAGE 电泳，电泳结果采用银染方法检测。根据所得结果可以大致了解天然麝香中所含蛋白质或肽类的分子量，以此确定后续的实验方案。本次实验确定对分子量为 8kDa 以下的部分进行色谱

分析, 色谱柱为 **Superdex Peptide Hr 10/30**(Pharmacia), 用 **ddH₂O** 平衡 2 柱床体积, 取 **200 μL** 样品上柱, 用 **ddH₂O** 洗脱 **1.5** 柱床体积, 流速为 **0.5ml/min**。分别接收各洗涤峰, 共获得 **4** 个洗涤峰 (见图 1。A:紫外吸收曲线; B: 电导曲线; 1: 洗脱峰 1; 2: 洗脱峰 2; 3: 洗脱峰 3; 4: 洗脱峰 4), 即初步表明, 在该分子量范围有 **4** 个组份, 对 **4** 个组分分别进行药效学实验, 确定具有药效的组分后进行电泳, 将所获得的单一一条带 (见图 2。1, 2: 分离样品; M: 蛋白分子量标准) 进行氨基酸序列测定。

2. HPLC 分析

对预期的洗脱峰成分进行高压液相色谱 (HPLC) 分析, 进一步确定其中的组分是否为单一成分, 若非单一成分, 则可利用该法进行进一步分离纯化, 所得单一成分可直接用于氨基酸序列测定, 也可根据需要, 进一步作质谱分析。

3. 质谱分析和氨基酸序列测定

采用质谱分析技术, 对所得单一成分进行检测, 可获得氨基酸组成及序列数据, 借助进一步的氨基酸序列测定, 可确定末端的或全部的氨基酸序列, 由此可以推导出编码基因的序列, 用于化学合成或基因工程生产。

15 4. 基因序列的获得

由上述方法推导的基因序列, 由于密码子的兼并性, 可以有多种可能的序列, 对此可采用以下两种途径解决:

- a) 根据所选择的表达系统, 根据该系统中宿主细胞的密码子偏好性设计目的基因的序列, 然后进行人工合成, 经过序列测定, 确定所合成的序列无误。
- b) 根据推导的基因序列, 合成引物, 利用 **PCR** 方法获得麝香蛋白或多肽的编码基因: 首先, 采集林麝脐下腺, 提取其中的 **mRNA**, 进行 **RT-PCR**, 所得 **cDNA** 可用于制备 **cDNA** 文库或直接利用 **PCR** 方法获得目的基因序列。

25 5. 氨基酸序列的获得

由上述基因序列推导出一定数量的氨基酸序列, 利用生物信息技术, 结合药效资料确定候选序列, 委托美联 (西安) 生物科技有限公司进行化学合成, 合成产物必须进行质谱分析, 以确定合成质量 (见图 3-6)。合成的多肽序列如下:

SDSECPLLCEVWILK

30 **SDSECPLLPRQGTGSLH**

IDCECPPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ
SDSECPLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC

对上述的四条多肽的氨基酸序列进行比较，其均具有一段相同的氨基酸序列 **ECPLL**，并与上述多肽的序列具有 30% 以上雷同的多肽序列同样具有抗炎和免疫抑制活性，例如上述第一条序列 **SDSECPLLCEVWILK** 与第二条序列 **SDSECPLLPRQGTGSLH** 之间，二者在氨基酸序列相似性方面，对于前者来说有 53% 的一致性，而对于后者来说有 47% 的相似性。第一条序列 **SDSECPLLCEVWILK** 与第三条序列 **IDCECPPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ** 之间的氨基酸相似性，对于前者来说为 53%，而对于后者来说为 31%。第一条序列 **SDSECPLLCEVWILK** 与第四条序列 **SDSECPLLNGTNTSSRFESINCV FLSTEEGC** 之间的氨基酸相似性，对于前者来说为 73%，而对于后者来说为 34%。

上述序列相关多肽可以形成各种盐类，其中醋酸盐最为常见，有关资料表明，醋酸盐在提高溶解度、提高活性等方面有一定作用，醋酸含量通常为 10-15%。上述的多肽醋酸盐如下：

15 **(SDSECPLLCEVWILK)Ac**
 (SDSECPLLPRQGTGSLH)Ac
 (IDCECPPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ)Ac
 (SDSECPLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC)Ac

6. 合成多肽的药效学实验

20 (1) 小鼠耳部炎症实验——二甲苯诱导小鼠耳肿胀实验：

实验动物为 **K.M** 小鼠（二级），雄性，体重 20~24g，由中山大学实验动物中心提供。设模型对照组、阳性（氢化可的松）对照组、待测样品组。观察待测样品对二甲苯诱导的急性炎症的抑制作用。检测指标为耳肿胀度。给药途径为尾静脉注射，样品用无菌 PBS 稀释至所需浓度，给药剂量为：100 μ g/kg。结果显示，样品对二甲苯诱导 25 的小鼠耳肿胀具有显著的抑制作用，证明上述活性肽的抗炎活性显著。

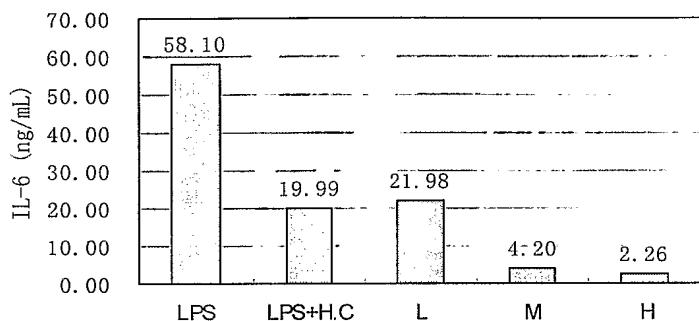
(2) LPS 诱导的小鼠炎症实验

设模型对照组、阳性（氢化可的松）对照组、待测样品组。观察待测样品对 LPS（脂多糖，Sigma 公司）诱导的急性炎症早期动物体内分泌炎症相关的细胞因子的激活、生物合成和释放的抑制作用。清洁级 Balb/c 小鼠由中山大学实验动物中心提供。30 用 ELISA 方法检测动物体内细胞因子水平。样品剂量为 25~100 μ g/kg，结果显示活性

肽具有非常显著的抑制炎症相关的细胞因子 (IL-6、TNF- α 、IFN- γ) 的作用。而且，样品对炎性细胞因子的抑制作用是氢化可的松 (糖皮质激素类药物) 的 500 倍以上，证明该药物具有抑制炎症和自身免疫性疾病的作用。

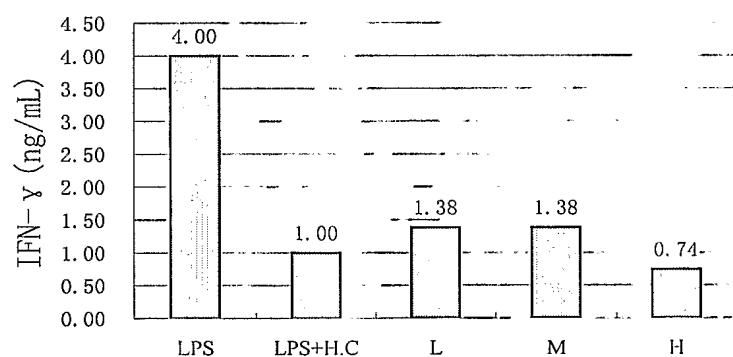
5

表一 活性肽对 LPS 诱导的小鼠炎症模型中小鼠血清 IL-6 含量的抑制作用



10

小鼠按 2.5mg/Kg 剂量腹腔注射 LPS (Sigma) 0.5 小时后，随机分 5 组：(1) 阴性对照组 (LPS)，腹腔注射生理盐水；(2) 阳性对照组 (LPS+H.C.)，按 2.5mg/Kg 剂量腹腔注射氢化可的松；(3) 活性肽低剂量组 (L)，按 25 μ g/Kg 剂量腹腔注射；(4) 活性肽中剂量组 (M)，按 50 μ g/Kg 剂量腹腔注射；(5) 活性肽高剂量组 (H)，按 100 μ g/Kg 剂量腹腔注射；2 小时后 ELISA 法测各组小鼠血清中 IL-6 的含量。

表二 活性肽对 LPS 诱导的小鼠炎症模型中小鼠血清 IFN- γ 含量的抑制作用

15

小鼠按 2.5mg/Kg 剂量腹腔注射细菌内毒素 (Sigma) 0.5 小时后，随机分 5 组：(1) 阴性对照组 (LPS)，腹腔注射生理盐水；(2) 阳性对照组 (LPS+H.C.)，按 2.5mg/Kg 剂量腹腔注射氢化可的松；(3) 活性肽低剂量组 (L)，按 25 μ g/Kg 剂量腹腔注射；(4) 活性肽中剂量组 (M)，按 50 μ g/Kg 剂量腹腔注射；(5) 活性肽高剂量组 (H)，按 100 μ g/Kg 剂量腹腔注射；2 小时后 ELISA 法测各组小鼠血清中 IFN- γ 的含量。

(3) 大鼠佐剂性关节炎实验：该模型是一种 T 细胞介导的自身免疫性疾病模型，常用于对类风湿性疾病的镇痛消炎剂和免疫抑制剂的研究。用 Freund's 完全佐剂 (FCA) 皮内注射大鼠右侧足跖后，首先出现局部急性炎症反应，继而发生全身性迟发型变态反应，表现为多发性关节炎。检测指标：足肿胀、耳部红斑和尾部炎性小结、5 体重变化。实验动物为雄性 Wistar 大鼠 (二级)，体重 $180\pm20\text{g}$ ，由第一军医大学实验动物中心提供 (动物质量合格证号：0000830, 0000858)，以吲哚美辛为阳性对照，结果表明，样品对关节炎的抑制作用显著，作用剂量为 $1.2\sim6\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

(4) 鼠急性毒性试验

实验动物为 NIH 系清洁级小白鼠 (合格证号：2002A022)，雌雄各半，体重 $20\sim22\text{g}$ ，10 购自广东省医学实验动物中心。一次性尾静脉注射给药，立即观察小鼠的急性毒性反应，连续一周。结果无一动物死亡，而且未见明显毒性反应。实验结果提示样品的 $\text{LD}_{50}>5\text{mg}/\text{kg}$ ，说明样品的安全性高。

(5) 神经性皮炎：

患病多年久治不愈的患者自愿试用 (外用)。试用者自认效果非常好。

权利要求

- 1、一种从麝香的有效成分中获得的氨基酸序列 **SDSECPLLCEVWILK** 及其醋酸盐 (**SDSECPLLCEVWILK**) **Ac**。
- 5 2、一种麝香的有效成分中获得的氨基酸序列 **SDSECPLLPRQGTGSLH** 及其醋酸盐 (**SDSECPLLPRQGTGSLH**) **Ac**。
- 3、一种从麝香的有效成分中获得的氨基酸序列 **IDCECPPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ** 及其醋酸盐 (**IDCECPPLLEAKCPSFPLWPQGREERQ**) **Ac**。
- 10 4、一种从麝香的有效成分中获得的氨基酸序列 **SDSECPLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC** 及其醋酸盐 (**SDSECPLLNGTNTSSRFESINCVFLSTEEGC**) **Ac**。
- 5、与权利要求 1、2、3 或 4 具有 30% 以上雷同，并具有氨基酸序列片段 **ECPLL** 的氨基酸序列及其醋酸盐。
- 15 6、权利要求 1、2、3、4、5 所述的氨基酸序列及其醋酸盐作为抗炎药物或免疫抑制剂药物的应用。
- 7、与权利要求 1、2、3 或 4 所述的氨基酸序列的制备方法：将麝香的活性多肽或蛋白
白进行分离纯化，得到有药用价值的活性多肽/蛋白；利用药效学分析方法确证其
药效后，进行氨基酸序列测定；然后，从动植物的功能活性部位或组织中制备 **cDNA**
20 文库，从中获取编码活性肽的目的基因；从而得到活性多肽的氨基酸序列。

1/6

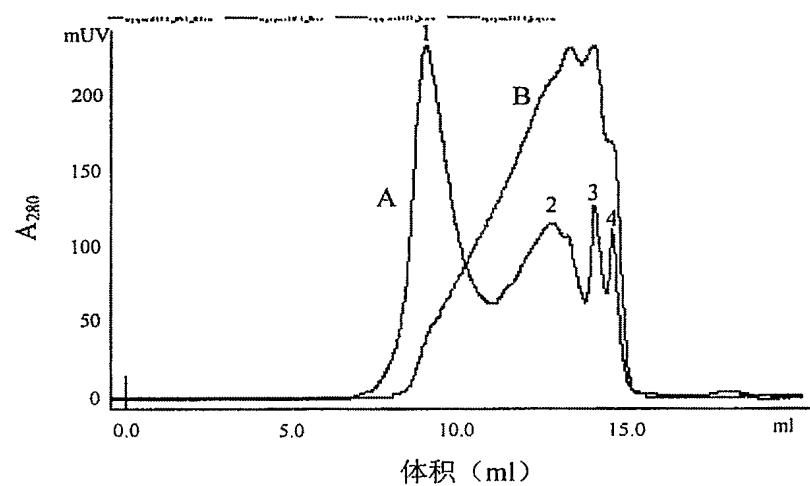


图 1

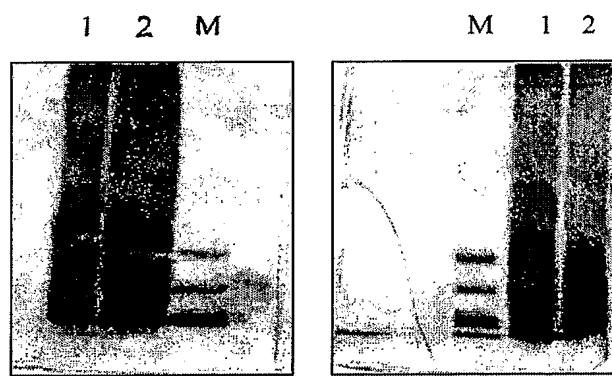


图 2

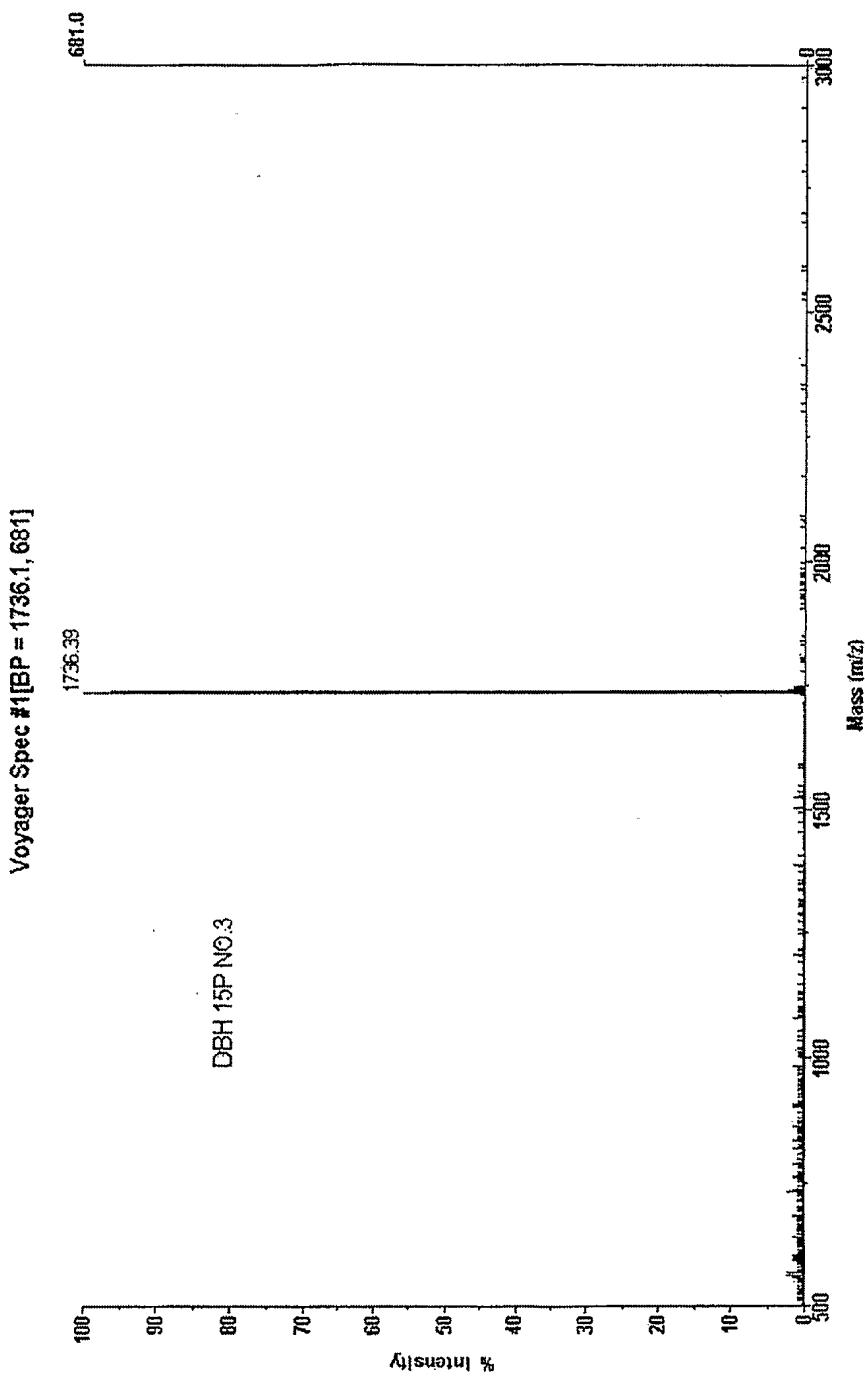


图 3

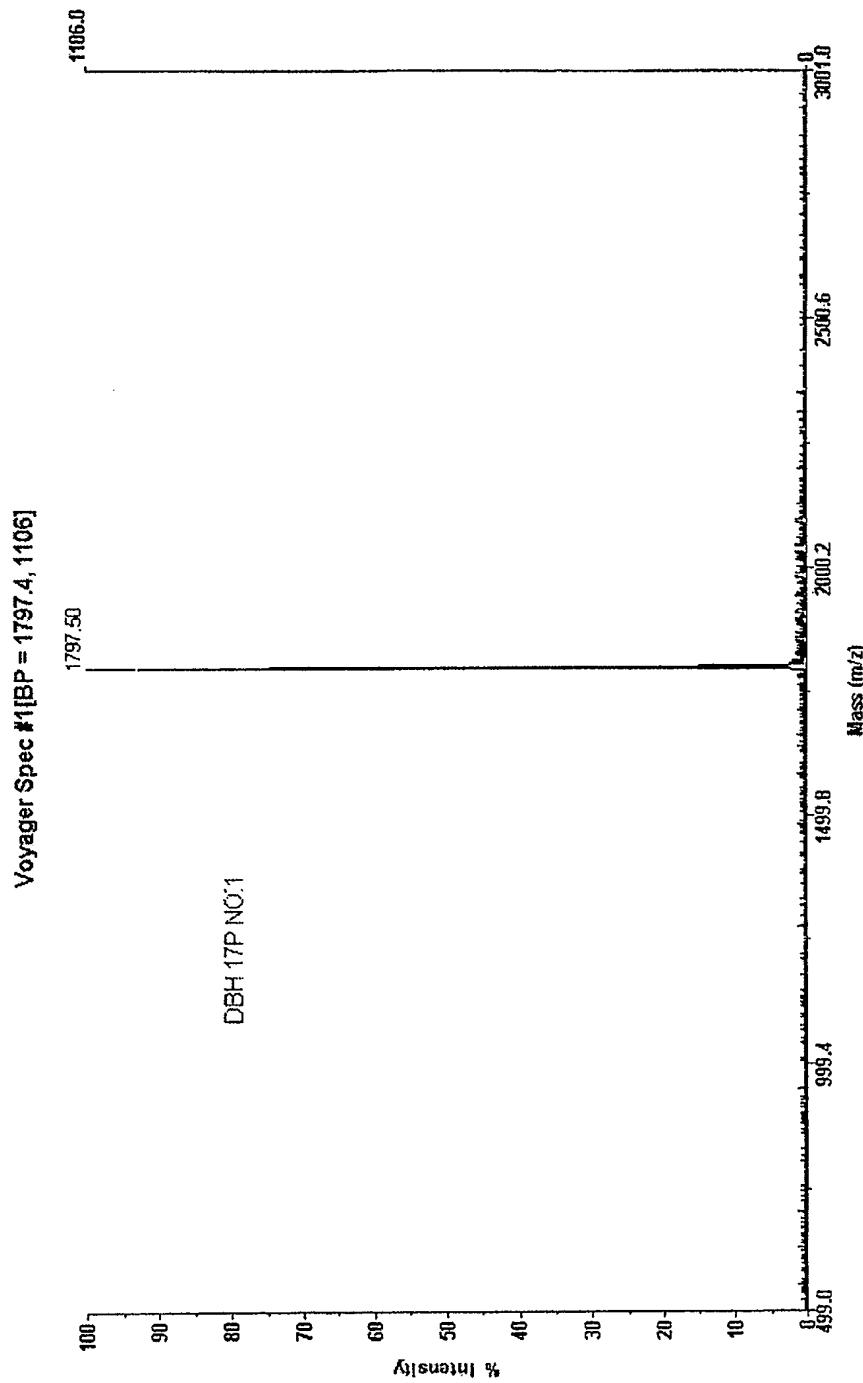


图 4

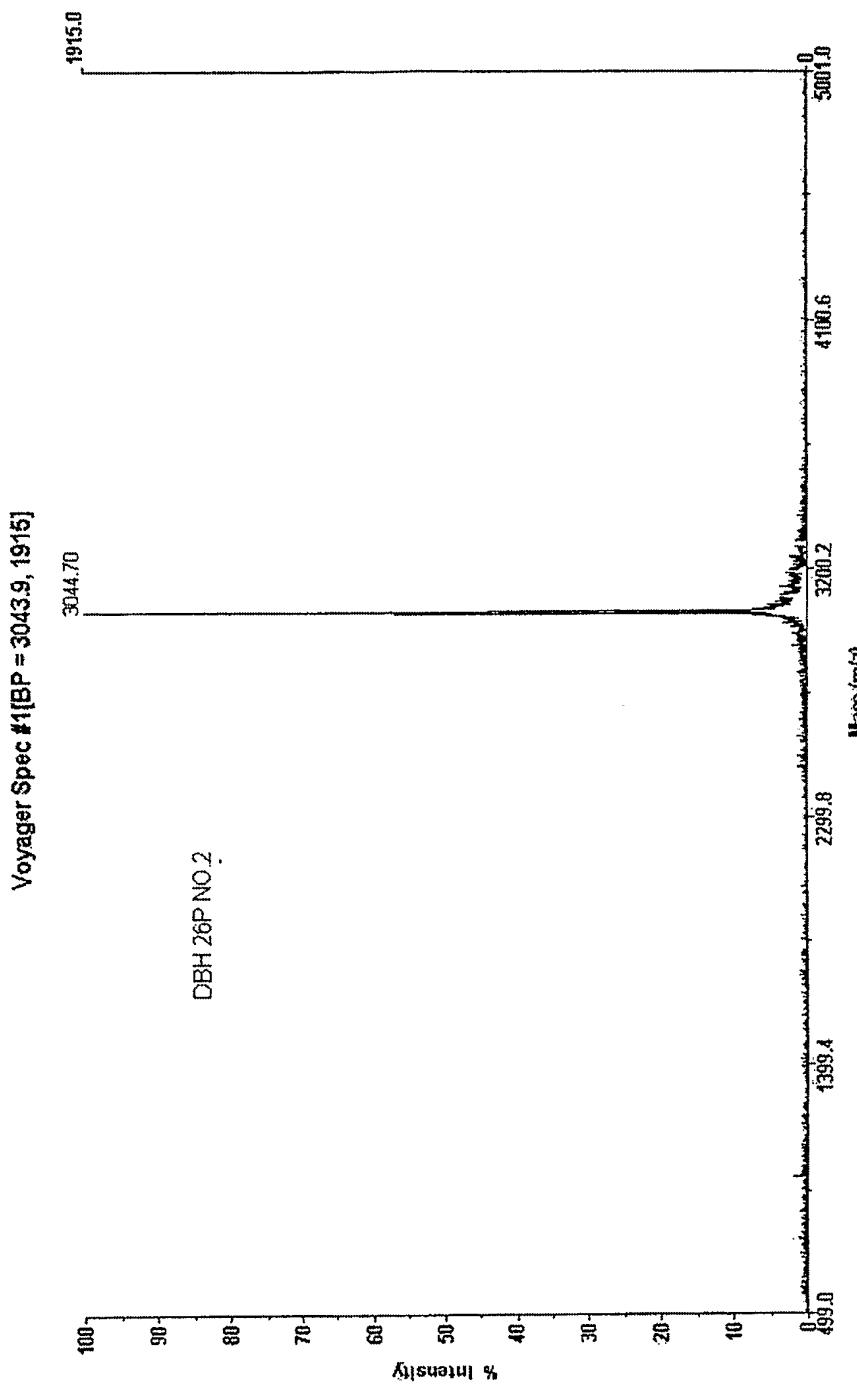


图 5

5/6

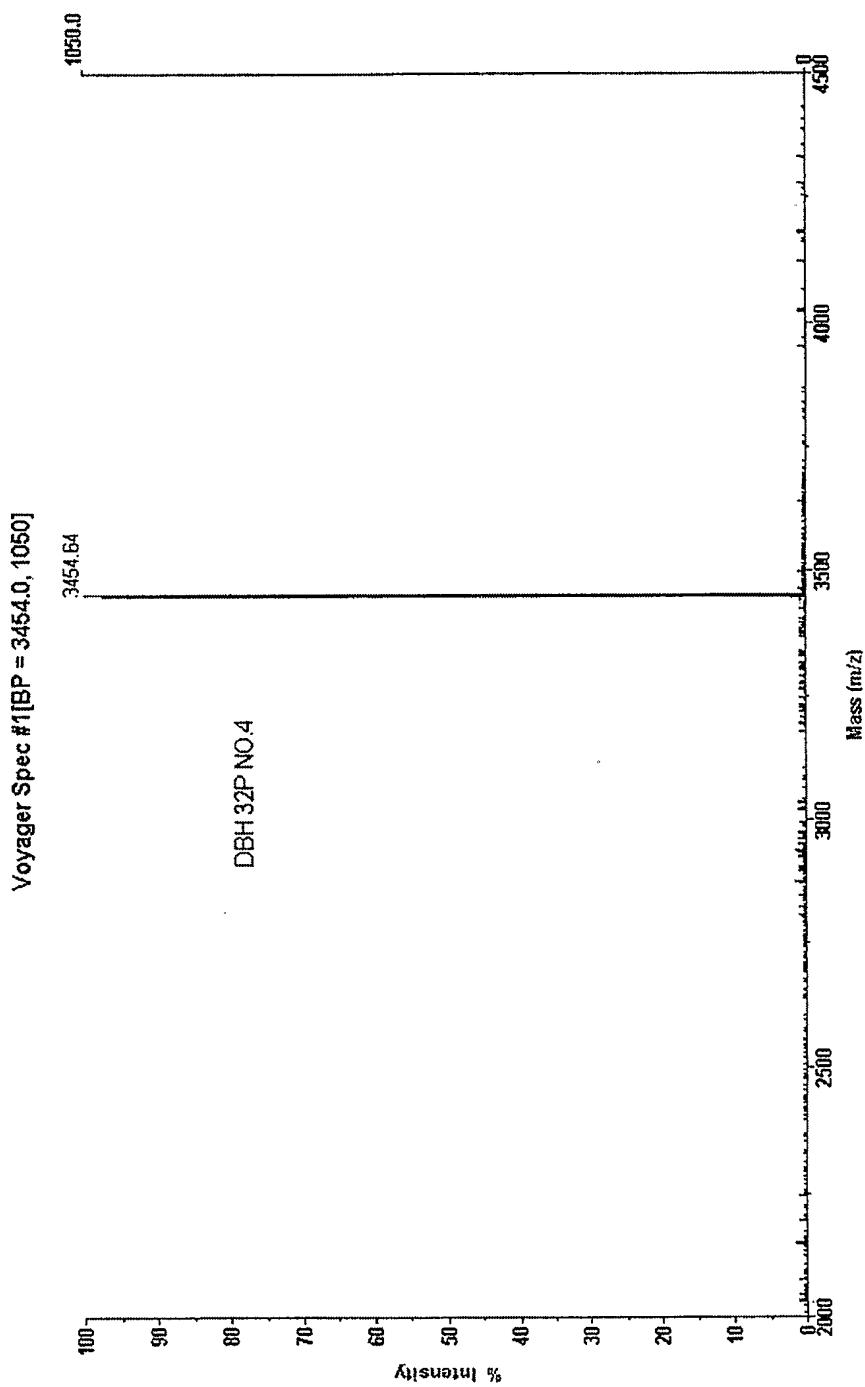


图 6

6/6

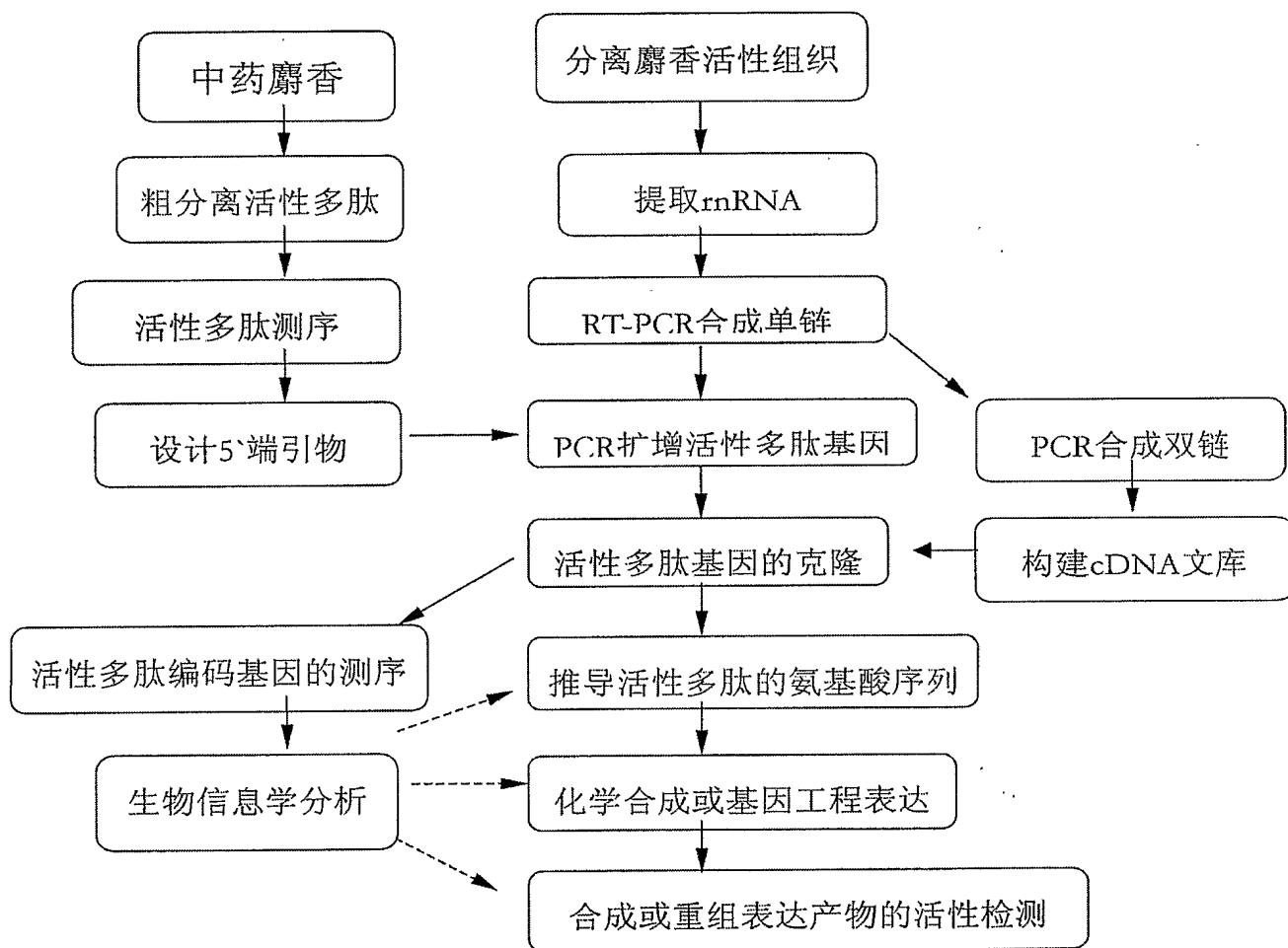


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/001362

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C07K7/08,C07K14/47,A61P29/00, A61P37/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C07K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CPRS, BA, WPI, EPODOC, PAJ, GENBANK: musk,Peptide,protein,inflammation,immunity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | ACTA ZOOLOGICA SINICA, Vol.38, No.3 Sept.1992, LIU Xue-mei et al. "STUDIES ON THE ANTIINFLAMMATORY PROTEIN OF MUSK.I.ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES", page 302-308, the whole document | 1-7 |
| A | Acta Pharmaceutica Sinica,1988;23(6), Zhu Xiuyuan et al. "THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF MUSK II. THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE ACTIVE COMPONENTS OF MUSK", page 406-410, the whole document | 1-7 |
| A | Chinese Journal of Pathophysiology 2002,18(10),XIAO Qing-zhong et al. "Adult rat and human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into meurons with Musk's | 1-7 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search 25.Feb.2005(25.02.2005) | Date of mailing of the international search report 17 • MAR 2005 (17 • 03 • 2005) |
| Name and mailing address of the ISA/ 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. (86-10)62019451 | Authorized officer TANG Hui Telephone No. (86-10)62085074  |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/001362

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category [*] | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------------------|---|-----------------------|
| A | polypeptide", page 1179-1182, the whole document Chinese Traditional Medicine, 1998 Vol.29 No.5, Wang Wenjie et al. "Effect of Musk on Certain Functions of Rat Neutrophil Activated by PAF <i>in vitro</i> ", page 322-324, the Whole document | 1-7 |
| A | ACTA ACADEMIAE MEDICINAE SINICAE, June 1997, Vol.19, No.3, Wang Wenjie et al. "Effects of the Glucoprotein Component of Musk on the Function of Rat Polymorphonuclear Leukocytes Activated by fMLP <i>in vitro</i> ", Page 222-226, the whole document | 1-7 |
| A | China Journal of Chinese Materia Medica, 1998, Vol.23, No.4, Wang Wenjie et al. "Effects of the Glucoprotein Component of Musk on Functions of Rat Polymorphonuclear Leukocytes Activated by LT _B ₄ <i>in vitro</i> ", Page 238-241, the whole document | 1-7 |
| A | China Journal of Chinese Materia Medica, Dec., 2000, Vol.25, No.12, Wang Wenjie et al. "Effects of Musk Glucoprotein on PAF Production and Cytosolic Ca ²⁺ Level in Rat Polymorphonuclear Leukocytes in Vitro", Page 733-736, the whole document | 1-7 |
| A | China Journal of Chinese Materia Medica Jan., 2001, Vol.26, No.1, Wang Wenjie et al. "Effects of Musk Glucoprotein on the Function of Rat Polymorphonuclear Leukocytes Activated by IL-8 <i>in Vitro</i> ", Page 50-52, the whole document | 1-7 |
| A | China Journal of Chinese Materia Medica, Jan., 2003, Vol.28 No.1, Wang Wenjie et al. "Effects of Musk Glucoprotein on Chemotaxis of Polymorphonuclear Leukocytes <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> ", page 59-62, the whole document | 1-7 |
| A | China Tumor Clinic, 1998, Vol.25, No.11, Meng Zhaohua et al. "Impact of Subcutaneously Embedded Musk on the Growth of Transplanted Tumor in Pure-bred Rats", Page 834-836 The whole document | 1-7 |

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/001362

A. 主题的分类

IPC⁷ C07K7/08,C07K14/47,A61P29/00, A61P37/06

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁷ C07K,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CPRS, BA, WPI, EPPODOC, PAJ, GENBANK: 麝香, 氨基酸, 肽或蛋白, 抗炎, 免疫, musk, Peptide, protein, inflammation, immunity

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|------|---|---------|
| A | “动物学报” 1992 年 9 月第 38 卷第 3 期, 柳雪枚等, “天然麝香抗炎蛋白质的研究 I.M-u-a-1 的分离纯化及其部分性质的鉴定” 第 302-308 页, 全文 | 1-7 |
| A | “药学学报” 1988 年第 23 卷第 6 期, 朱秀媛等, “麝香的药理研究 II. 麝香及其有效成分的抗炎作用” 第 406-410 页 | 1-7 |
| A | “中国病理生理杂志” 2002 年第 18 卷第 10 期, 肖庆忠等, “麝香多肽体外诱导成年大鼠和人骨髓间充质干细胞定向分化为神经元的研究” 第 1179-1182 页, 全文 | 1-7 |
| A | “中草药” 1998 年第 29 卷第 5 期, 王文杰等, “麝香糖蛋白成分对血小板活化因子激活的大鼠中性白细胞功能的影响” 第 322-324 页, 全文 | 1-7 |

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“&” 同族专利的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

国际检索实际完成的日期

25.2 月.2005 (25.02.2005)

国际检索报告邮寄日期

17.3 月 2005 (17.03.2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

唐慧

电话号码: (86-10)62082074



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/001362

C(续). 相关文件

| 类 型 | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|-----|--|---------|
| A | “中国医学科学院学报”1997 年 6 月第 19 卷第 3 期, 王文杰等, “麝香糖蛋白成分对趋化三肽激活的大鼠中性白细胞功能的影响”第 222-226 全文 | 1-7 |
| A | “中国中药杂志”1998 年第 23 卷第 4 期, 王文杰等, “麝香糖蛋白成分对白三烯 B ₄ 激活的大鼠中性白细胞功能的影响”第 238-240 页, 全文 | 1-7 |
| A | “中国中药杂志”2000 年第 25 卷第 12 期, 王文杰等, “麝香糖蛋白成分对大鼠中性白细胞血小板活化因子生成及细胞内钙水平的影响”第 733-736 页, 全文 | 1-7 |
| A | “中国中药杂志”2001 年第 26 卷第 1 期, 王文杰等, “麝香糖蛋白对细胞介素-8 激活的大鼠中性白细胞功能的影响”第 50-52 页, 全文 | 1-7 |
| A | “中国中药杂志”2003 年第 28 卷第 1 期, 王文杰等, “麝香糖蛋白成分对中性白细胞趋化反应的抑制作用”第 59-62 页, 全文 | 1-7 |
| A | “中国肿瘤临床”1998 年第 25 卷第 11 期, 孟照华等, “皮下埋藏麝香对 BALB/c 纯系小鼠恶性肿瘤生长影响的实验研究”第 834-836 页 全文 | 1-7 |